Gouvernement du Canada
Government of Canada

Service canadien des forêts
Canadian Forestry Service

Courbe dose-mortalité de Choristoneura fumiferana (Clem.) infectée par une microsporidie, Nosema fumiferanae

G.G. Wilson

Rapport d'information FPM-X-68F
Institut pour la répression des ravageurs forestiers

IRRF

86-1297/

COURBE DOSE-MORTALITÉ DE *CHORISTONEURA FUMIFERANA* (CLEM.) INFECTÉE PAR UNE MICROSPORIDIE, *NOSEMA FUMIFERANAE*

RAPPORT D'INFORMATION FPM-X-68F

G.G. WILSON

INSTITUT POUR LA RÉPRESSION DES RAVAGEURS FORESTIERS
GOUVERNEMENT DU CANADA
SERVICE CANADIEN DES FORÊTS
1219, RUE QUEEN EST
C.P. 490
SAULT-STE-MARIE (ONTARIO)
P6A 5M7

1985

©MINISTRE DES APPROVISIONNEMENTS ET SERVICES CANADA, 1985

N° de catalogue	Fo 46-16/68F
ISSN:	0827-1119
ISBN:	0-662-93286-2

Des exemplaires supplémentaires du présent rapport peuvent être obtenus auprès des:

Services de liaison et d'information
Institut pour la répression des ravageurs forestiers
Service canadien des forêts
Gouvernement du Canada
C.P. 490
Sault-Ste-Marie (Ontario)
Canada, P6A 5M7

This publication is also available in English under the title *Dosage-Mortality Response of* Choristoneura Fumiferana *(Clem.) to a Microsporidium,* Nosema Fumiferanae.

RÉSUMÉ

On a déterminé, chez la larve du quatrième stade de *Choristoneura fumiferana*, le taux de mortalité en réaction aux doses d'une microsporidie, *Nosema fumiferanae*. D'après les analyses des probits, la DL_{50} est de 2,81 x 10^6 spores par larve, les limites inférieures et supérieures de confiance à 95% étant de 2,57 et de 3,01 x 10^6 spores par larve respectivement. Le nombre moyen de jours pour atteindre une mortalité larvaire de 50% était d'environ 17. Le taux maximal de *N. fumiferanae* (20,7 x 10^6 spores par mg de poids corporel) a été observé après l'ingestion de 5 x 10^6 spores.

ABSTRACT

Dosage-mortality response of 4th-instar *Choristoneura fumiferana* to a microsporidian parasite, *Nosema fumiferanae*, was determined. Probit analysis produced an LD_{50} of 2.81 x 10^6 spores per larva with 95% lower and upper fiducial limits of 2.57 x 10^6 and 3.01 x 10^6 spores per larva, respectively. The mean number of days to 50% larval mortality was about 17 days. The greatest intensity of *N. fumiferanae* (20.7 x 10^6 spores per mg body weight) occurred after 5 x 10^6 spores were ingested.

INTRODUCTION

Nosema fumiferanae est une microsporidie qui parasite naturellement la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *Choristoneura fumiferana* (Thomson, 1955). La tordeuse des bourgeons de l'épinette est l'insecte ravageur des forêts originaire du continent nord-américain le plus largement répandu; c'est pourquoi il importe de bien connaître la relation hôte-parasite lorsqu'on envisage l'utilisation du parasite comme agent de lutte contre la tordeuse. L'étude de cette relation peut se faire à l'aide du dosage biologique qui consiste habituellement à infecter des insectes d'un âge donné avec une quantité mesurée de l'agent microbien étudié et à mesurer un effet comme la mortalité des insectes traités ou le nombre de jours nécessaires pour que la mortalité se manifeste (Burges et Thomson, 1971). Si l'on veut utiliser des agents microbiens pour lutter contre les insectes ravageurs, il faut déterminer la dose qui donnera le degré de répression souhaité.

Une technique de dosage de *N. fumiferanae* et de son hôte, la tordeuse des bourgeons de l'épinette, a été mise au point (Wilson, 1983); toutefois, on a rencontré des difficultés dues à la perte des spores sur les aiguilles traitées, surtout à doses élevées. Le présent rapport fait état des résultats obtenus (efficacité accrue de parasite) avec l'utilisation d'un adhésif-mouillant, ce qui donne un dosage biologique plus précis.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'élevage des insectes, la réalisation de la capsule de dosage biologique et la préparation des spores de *N. fumiferanae* ont fait l'objet d'un rapport détaillé (Wilson, 1983). Toutes les expériences ont été réalisées avec des larves de tordeuse des bourgeons de l'épinette exemptes de maladie et arrivées au 4^e stade larvaire. Les larves ont été soumises au régime suivant : 16 h de période claire et 8 h de période sombre par jour, température de 23 ± 1°C et une humidité relative de 60-80%. La capsule de dosage biologique a été montée en plaçant une aiguille de sapin baumier *Abies balsamea* à travers une ouverture dans le couvercle d'une capsule d'inclusion de Beem. Les spores de *N. fumiferanae* ont été obtenues à partir de tordeuses infectées, élevées dans le laboratoire; avant d'être utilisées, ces spores ont été entreposées dans de l'eau distillée à 5°C pendant une période allant jusqu'à 4 semaines.

Chaque aiguille de sapin baumier a été traitée avec une suspension de 5 µL de spores de *N. fumiferanae* pour obtenir des concentrations de 5×10^5, 1×10^6 et 1×10^7 spores par aiguille. La suspension contenait 0,5% (V/V) de Nu-Film, un adhésif-mouillant. On permettait à une larve de se nourrir sur une aiguille pendant 72 h; les larves ayant

Tableau 1. Effets de diverses doses de spores de *Nosema fumiferanae* sur la mortalité, sur le nombre de jours avant manifestation de la mortalité et sur le degré d'intensité de l'infection par les spores, après ingestion des spores par des larves de tordeuse des bourgeons de l'épinette du 4e stade larvaire.

Dose Nbre de spores/ larve	Nombre testé	Mortalité larvaire en pourcentage	Nbre moyen de jours avant manifestation de la mortalité ± E.T.	Mortalité pupale en pourcentage	Nbre moyen de spores/mg de tissu x 10^6 ± E.T.	Nbre moyen de spores/adulte x 10^6 + E.T.	
Témoin	52	6	-	0	-	-	-
5 x 10^5	78	9	23,0±10,7	5	11,8± 9,2	295±157	560±221
1 x 10^6	73	15	19,3± 4,5	2	14,9± 9,9	285±105	592±218
5 x 10^6	42	83	16,5± 8,4	0	20,7±23,7	-	-
1 x 10^7	46	91	14,2± 6,5	0	13,2±11,0	-	-
5 x 10^7	40	100	12,7± 4,6	0	9,9± 9,3	-	-

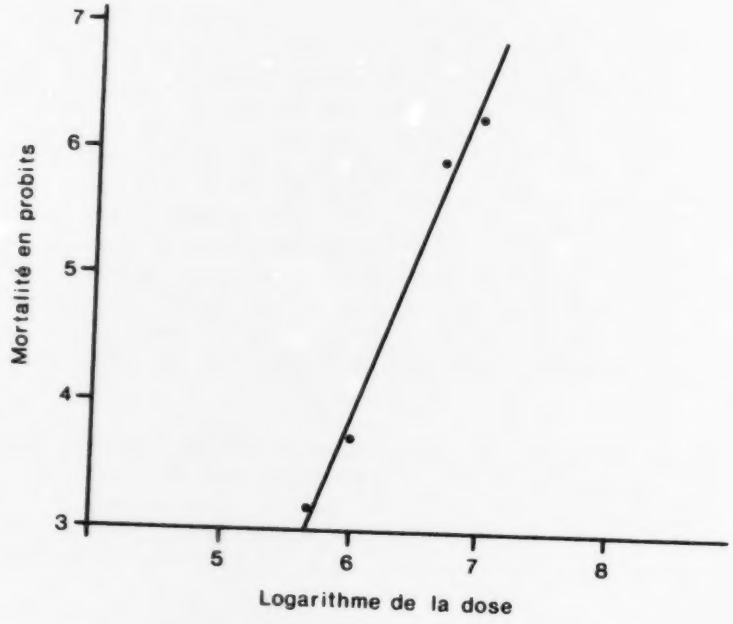

Fig. 1. Courbe dose-mortalité larvaire après ingestion de spores de *Nosema fumiferanae* par des larves de *Choristoneura fumiferana* au 4e stade larvaire.

consommé toute la zone traitée étaient retirées et nourries à l'aide d'aliments artificiels. Tous les insectes ont été élevés séparément. Des larves témoins ont été traitées d'une manière semblable, sauf qu'elles ont été exposées à 5 µL d'eau distillée contenant 0,5% (V/V) de Nu-Film. Les expériences ont été répétées trois fois avec 15-30 larves par dose. Pour chaque concentration de spores, on a enregistré la mortalité larvaire, le nombre de jours avant manifestation de la mortalité larvaire et le degré d'intensité de l'infection (nombre de spores de microsporidies chez chacun des hôtes infectés). On a procédé au dénombrement des spores par la méthode de Cantwell (1970), chez les insectes, après séchage à l'air pendant au moins 7 jours à environ 32°C. On a aussi déterminé le poids des insectes.

Les résultats ont été analysés à l'aide de la distribution de F pour l'égalité des moyennes et la dose létale médiane (DL_{50}) a été déterminée par analyse des probits (Finney, 1971).

RÉSULTATS

Une mortalité larvaire importante (83%) est survenue après l'ingestion de 5×10^6 spores; la dose de 5×10^7 spores a entraîné une mortalité de 100% (Tableau 1). Lorsqu'on a tracé le graphique de la mortalité en probits en fonction du logarithme des doses, on a obtenu une ligne de régression dose infectieuse-effet ($y = -12,34 + 2,69x$) avec une erreur type de 0,32 (Figure 1). La valeur de la DL_{50} était de 2,81 $\times 10^6$ spores par larve, les limites inférieures et supérieures de confiance, au seuil de probabilité de 95%, étant respectivement de 2,57 $\times 10^6$ et 3,01 $\times 10^6$ spores par larve.

Le nombre moyen de jour avant la mort en fonction des diverses doses testées est indiqué au Tableau 1 et à la Figure 2A. Plus la dose augmentait, plus le nombre de jours avant la mort diminuait. La variation de la mortalité entre la dose la plus faible (5×10^6 spores) et la dose la plus élevée (5×10^7 spores) était de 23,0 ± 10,7 à 12,7 ± 4,6 jours. Le nombre moyen de jours nécessaires pour obtenir une mortalité larvaire de 50% était d'environ 17 jours.

On a observé une baisse substantielle dans le poids des larves (séchées à l'air) au fur et à mesure que la dose augmentait, la baisse la plus importante étant liée aux doses variant de 5×10^5 à 5×10^6 spores par larve (Fig. 2B). Avec ces doses, le poids moyen a baissé de 4,8 à 0,65 mg. Une analyse de la variance a indiquée que cette différence entre les moyennes était significative au seuil de 1%.

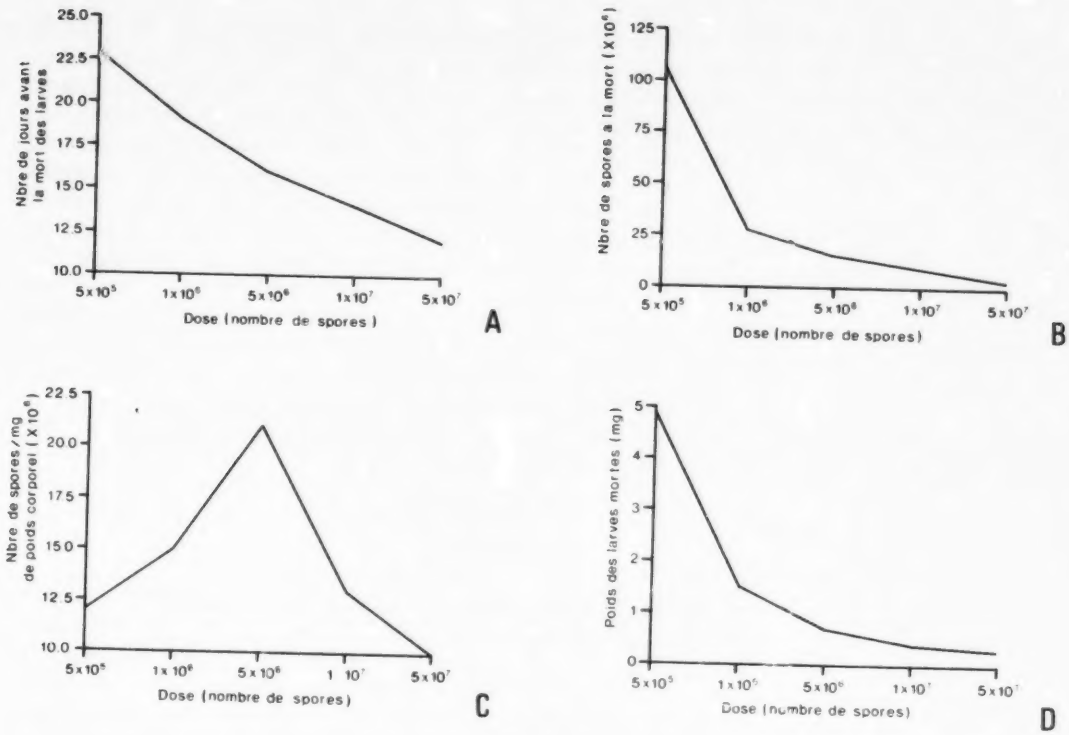

Fig. 2. Effets des diverses doses de spores de *N. fumiferanae* sur : A, nombre de jours avant la mort des larves; B, poids de la larve morte; C, nombre de spores par mg de poids corporel; et D, nombre de spores par larve de *Choristoneura fumiferana* du 4e stade larvaire.

La Figure 2C indique le nombre moyen de spores de *N. fumiferanae* par mg de poids corporel (séchées à l'air) après ingestion de différentes doses de spores. L'intensité maximale d'infection par *N. fumiferanae* (20,7 x 10^6 spores par mg de poids corporel) a été observée après l'ingestion de 5 x 10^6 spores. Toutefois, l'écart-type indique une variation considérable par rapport à la moyenne (Tableau 1). Le dénombrement moyen réel de spores par larve à la mort a diminué avec l'augmentation de la dose de spores (Fig. 2D). Le dénombrement des spores a varié de 106,9 x 10^6 à 2,8 x 10^6 spores par larve pour des doses variant de 5 x 10^5 à 5 x 10^7 spores.

DISCUSSION

La production de spores à partir des insectes morts et le nombre de spores que des adultes actifs peuvent héberger sont importants lorsqu'on envisage le rôle d'un parasite de type microsporodie dans la

nature. De plus, si le parasite doit être produit en masse pour libération dans les champs, la production de spores à partir des larves infectées est importante. Dans la présente expérience, le nombre de spores par mg de tissu a augmenté avec la dose jusqu'à ce que la dose atteigne la valeur de 5×10^6 spores; à partir de cette valeur, la production de spores a diminué, probablement parce que la durée de la vie larvaire de l'insecte est raccourcie lorsqu'on utilise des doses de spores plus élevées. Il y a une variation considérable dans les dénombrements de spores; cette situation a été signalée pour d'autres insectes. Hostounsky et Weiser (1972) ont inoculé des larves de *Mamestra brassicae* du 4e stade larvaire en exposant les chenilles à des concentrations différentes de spores de *N. plodiae*. Il ont eux aussi noté une grande variation dans les dénombrements de spores réalisés à la mort des larves infectées.

En général, la mortalité des insectes est liée à l'importance de la dose initiale de spores de microsporodie reçue. Dans les expériences antérieures portant sur la tordeuse des bourgeons de l'épinette, *N. fumiferanae* était introduit dans la nourriture de l'hôte et on supposait que le nombre de spores ingérées était proportionnel à la dose appliquée. Après une expérience de ce type, Wilson (1974) a indiqué que la DL_{50} pour les larves du 4e stade larvaire était d'environ 2×10^7 spores par mL de la suspension appliquée aux bourgeons de sapin baumier. Dans une expérience plus récente (Wilson, 1983), les spores ont été appliquées sur des aiguilles individuelles de sapin baumier. On a éprouvé des difficultés à cause de la perte des spores sur les aiguilles et les résultats étaient semblables à ceux de l'expérience réalisée en 1974. Toutefois, avec l'utilisation d'un adhésif-mouillant, on a obtenu une meilleure adhésion des spores; on a calculé une DL_{50} de $2{,}8 \times 10^6$ spores pour les larves du 4e stade larvaire. De nombreux rapports indiquent une DI_{50} (dose infectieuse) ou une CI_{50} (concentration infectieuse) pour diverses microsporidies et leurs hôtes, mais ils n'indiquent pas de DL_{50}. On ne peut supposer qu'un insecte va mourir parce qu'il est infecté; en fait, Weiser (1976) a signalé que dans certains rapports qu'il a examinés, les doses infectieuses n'étaient habituellement pas mortelles. Les rapports indiquent qu'on peut observer une variation considérable de la virulence chez différentes espèces de *Nosema*. Par exemple, Kellen et Lindegren (1974) ont déterminé la relation dose-mortalité entre *Plodia interpunctella* et deux microsporodies, *N. plodiae* et *Nosema heterosporum*, après ingestion de ces dernières par des larves âgées de 10 jours. Dans le cas de *N. plodiae*, la DL_{50} était de $8{,}09 \times 10^6$ spores par g de ration alimentaire, tandis qu'elle était de $4{,}52 \times 10^3$ dans le cas de *N. heterosporum*. La DL_{50} pour la tordeuse des bourgeons de l'épinette se rapproche davantage de celle qui est due à la microsporodie moins virulente *N. plodiae*. Les auteurs ont laissé entendre que la microsporodie la moins virulente pouvait se maintenir dans une population parce qu'il pouvait y avoir transmission transovarienne et qu'il pouvait y avoir des infections non

létales. Ainsi, il ne serait pas nécessaire de réintroduire de façon répétée le parasite dans le cadre des programmes de répression. Cette situation serait également vraie dans le cas de *N. fumiferanae* et de la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Mlle E. Young pour son aide technique.

RÉFÉRENCES

Burges, H.D. and E.M. Thomson. 1971. Standardization and assay of microbial insecticides. pp. 603-616 *In* Microbial Control of Insects and Mites. Edited by H.D. Burges and N.W. Hussey. Academic Press, New York.

Cantwell, G.E. 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. Am. Bee J. 110:222-223.

Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. 3rd ed. University Press, Cambridge.

Hostounsky, J. and J. Weiser. 1972. Production of spores by *Nosema plodiae* Kellen et Lindegren in *Mamestra brassicae* L. after different infective dosage, I. Vest. Cs. Spol. Zool. 36:97-100.

Kellen, W.R. and J.E. Lindegren. 1974. Comparative virulence of *Nosema plodiae* and *Nosema heterosporum* in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. J. Invert. Pathol. 23:242-245.

Thomson, H.M. 1955. *Perezia fumiferana* n. sp., a new species of microsporida from the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.). J. Parasitol. 41:1-8.

Weiser, J. 1976. Microsporidia in invertebrates: host-parasite relations at the organismal level. pp. 163-201 *In* Comparative Pathology. Vol. 1. Edited by L.A. Bulla, Jr. Plenum Press, New York and London.

Wilson, G.G. 1974. Effects of larval age at inoculation, and dosage of microsporidan (Nosema fumiferanae) *spores, on mortality of spruce budworm* (Choristoneura fumiferana). *Can. J. Zool. 52:993-996.*

Wilson, G.G. 1983. A dosing technique and the effects of sub-lethal doses of Nosema fumiferanae *(Microsporida) on its host the spruce budworm* Choristoneura fumiferana. *Parasitology 87:371-376.*